

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- ⓪ BLACK BORDERS
- ⓪ TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PRODUCTION OF SULFUR-CONTAINING L-AMINO ACID

Patent number: JP2222692
Publication date: 1990-09-05
Inventor: KATSUMATA RYOICHI; others: 01
Applicant: KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD
Classification:
- international: C12P13/12
- european:
Application number: JP19890044395 19890223
Priority number(s):

Abstract of JP2222692

PURPOSE: To obtain the subject compound useful for cosmetic, etc., on an industrial scale at a low cost by reacting O-acetyl-L-serine with a metal sulfide, etc., in the presence of cells of microorganism belonging to genus *Corynebacterium*, etc., and having O-acetylserine sulfhydrase activity.

CONSTITUTION: The objective sulfur-containing L-amino acid (e.g. L-cysteine) can be produced by reacting O-acetyl-L-serine with a metal sulfide, a metal hydrosulfide (e.g. sodium hydrosulfide) or hydrogen sulfide, etc., in the presence of cells, cultured product or their treated product of a microorganism belonging to genus *Corynebacterium* or genus *Brevibacterium* and having O-acetylserine sulfhydrase activity (e.g. *Brevibacterium flavum* ATCC 13826) to accumulate a sulfur-containing L-amino acid in the reaction mixture and collecting the objective reaction product from the reaction mixture.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

⑫ 公開特許公報(A)

平2-222692

⑤ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)9月5日

C 12 P 13/12

B 8931-4B

C 8931-4B

// (C 12 P 13/12

C 12 R 1:13)

(C 12 P 13/12

C 12 R 1:15)

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 L-含硫アミノ酸の製造法

⑮ 特 願 平1-44395

⑯ 出 願 平1(1989)2月23日

⑰ 発 明 者 勝 亦 一 東京都町田市山崎町1380

⑱ 発 明 者 横 井 治 彦 東京都町田市成瀬台2-32-4

⑲ 出 願 人 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明 細 書

用である。

従 来 の 技 術

従来のL-システインおよび/またはL-システインの酵素的合成法としては、プレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属またはアースロバクター属に属し、S-メチルシステインスルフォキシド、2-チアゾールアラニンまたはエチオニンに対する耐性を有する微生物を用いる方法(特公昭53-14637号公報)、サルモネラ・チフィリウムの粗抽出液中のO-アセチルセリンスルフィドラーゼ活性の作用によって、O-アセチル-L-セリンと水酸化ナトリウムから合成する方法(バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング(Biotechnology and Bioengineering) 30, 875 (1987))、β-置換アラニンと金属硫化物からシステイン・デスルフィドラーゼを用いて合成する方法(特公昭57-21311号公報)、L-セリンと金属硫化物などからトリプトファン・シンターゼを用いて合成する方法(特開昭62-143690号公報)などが知られて

1. 発明の名称

L-含硫アミノ酸の製造法

2. 特許請求の範囲

コリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属に属し、O-アセチルセリンスルフィドラーゼ活性を有する微生物の菌体、培養物またはその処理物の存在下、O-アセチル-L-セリンと金属硫化物、金属水硫化物または硫化水素とを反応させ、反応物中にL-含硫アミノ酸を生成蓄積させ、該反応物からL-含硫アミノ酸を採取することを特徴とするL-含硫アミノ酸の製造法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、微生物を利用してL-含硫アミノ酸とくにL-システインおよび/またはL-システインを製造する方法に関する。

L-システイン、L-システインなどのL-含硫アミノ酸は化粧品、医薬品、食品添加物として有

いる。

発明が解決しようとする課題

Ｌ－含硫アミノ酸とくにＬ－システインおよび／またはＬ－シスチンは近年ますます需要が増大しており、Ｌ－含硫アミノ酸をより効率よく製造するためにその製造法の改良は常に求められている。

課題を解決するための手段

コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物について検討の結果、Ｏ－アセチルセリンスルフィドラーゼ活性を有する微生物が見出され、該微生物の菌体を利用すれば効率よくＬ－システインが製造できることが見出された。

本発明によれば、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、Ｏ－アセチルセリンスルフィドラーゼ活性を有する微生物の菌体、培養物またはその処理物の存在下、Ｏ－アセチル－Ｌ－セリンと金属硫化物、金属水硫化物または硫化水素とを反応させ、反応物中にＬ－含硫アミ

ノ酸を生成習得させ、該反応物からＬ－含硫アミノ酸を採取することによりＬ－含硫アミノ酸を製造することができる。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明に用いられる微生物としては、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、Ｏ－アセチルセリンスルフィドラーゼ活性を有する微生物ならばいかなる微生物でも使用できる。また、Ｏ－アセチルセリンスルフィドラーゼ活性を有する限り、紫外線照射、Ｘ線照射あるいは変異物質による変異処理によって変異させた菌株も用いることができる。具体的に好適な例としては、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032、ATCC13032 より変異処理によって得られたトリプトファン・シンターゼ欠損株 TA108 (FERM BP-1846) あるいはプレビバクテリウム・フラブム ATCC13826 などがあげられる。

コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物の培養は、細菌の培養に通常用いられる合成ないし天然培地を用いておこなう

ことができる。培地中の炭素源としてはグルコース、フラクトース、シュークロース、マルトース、マンノース、澱粉、澱粉加水分解物あるいは糖蜜などの炭水化物、ピルビン酸、フマル酸、乳酸あるいは酢酸などの各種有機酸が使用できる。さらに菌の変化性によってアルコール類なども用いられる。

窒素源としては、アンモニアあるいは塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類、尿素、ペプトン、ＮＺ－アミン、肉エキス、酵母エキス、コーン・スチープ・リカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物、脱脂大豆粕あるいはその消化物、綿加水分解物などの窒素含有有機物などが使用可能である。

無機物としては、リン酸第一水素カリウム、リン酸第二水素カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンあるいは炭酸カル

シウムなどが使用できる。

微生物の生育に必要なビタミン、アミノ酸源などは、前記した他の培地成分によって培地に供給されればとくに加えなくてもよい。

培養は偏堊培養あるいは通気攪拌培養などの好氣的条件下でおこなう。培養温度は一般に 20 ～ 40℃ が好適である。培養中の培地の pH は中性付近に維持するのが望ましい。培養期間は通常 1 ～ 5 日間である。

このようにして得られた培養物あるいは培養物から遠心分離などによって採取された生菌体、その乾燥菌体、生菌体を磨砕、自己消化あるいは音波処理などを施すことにより得られる菌体処理物、これらの菌体の抽出物より得られる酵素含有物あるいは菌体もしくは酵素含有物を固定化した菌体処理物などを、Ｏ－アセチルセリンスルフィドラーゼの酵素源として用いることができる。

菌体、培養物またはその処理物の存在下、Ｏ－アセチル－Ｌ－セリンと金属硫化物、金属水硫化物または硫化水素とからＬ－含硫アミノ酸を生成

させる反応は、微生物の菌体、培養物またはそれらの処理物と、O-アセチル-L-セリンおよび金属硫化物、金属水硫化物または硫化水素とを含有する液とを混合する方法が好ましい。

反応液中のO-アセチル-L-セリンおよび硫化物などの基質濃度はとくに制限はないが、一般には液中濃度として0.1~20重量%の範囲で使用する。また反応に際しては、基質の他に補酵素であるピリドキサールリン酸を添加することが好ましい。ピリドキサールリン酸の添加量としては0.01mM~10mMが好適である。

金属硫化物としては、硫化ナトリウム、硫化カリウムなどがあげられ、金属水硫化物としては水硫化ナトリウムなどがあげられる。

反応液に加える菌体、培養物またはその処理物の量は菌体の処理方法によって異なるがとくに制限はなく、基質の濃度、酵素の活性、その他の様々な条件によって適宜変更できる。

菌体を酵素源として用いる場合、界面活性剤または有機溶剤を反応液中に添加することにより、

テリウム属に属する微生物によるグルタミン酸発酵において、その発酵生産物の収量を向上させることが知られている添加物、たとえばペニシリンなどを添加して培養し得られた菌体を用いる場合には、実施例4に示されるように界面活性剤または有機溶剤を添加しなくても良好な収量が得られる。

反応は通常10~50℃、pH6~10の範囲でおこなわれ、1~70時間で完了する。

反応液からのL-システインおよび/またはL-システインの分離精製は通常酵素反応、発酵液からアミノ酸の精製に用いられる方法を用いておこなうことができる。たとえば、反応終了後に反応液に通気をおこなえばL-システインは酸化されてL-システインとなって沈殿するので容易に単離できる。このようにして得られたL-システインは電気分解などによる還元により容易にL-システインとなる。

以下に本発明の実施例を示す。

より収率よく生成物を得ることができる。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・ステアリルアミン（たとえばナイミンS-215、日本油脂社製）、セチルトリメチルアンモニウムブロマイドなどのカチオン性界面活性剤、ナトリウムオレイルアミド硫酸などのアニオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン・モノステアレート（たとえばノニオンST221、日本油脂社製）などの非イオン性界面活性剤など、O-アセチル-L-セリンと金属硫化物、金属水硫化物または硫化水素からL-含硫アミノ酸の生成を促進するものならばいずれでも使用でき、これらは通常1~50mg/ml、好ましくは1~20mg/mlの濃度で用いられる。

有機溶剤としては、トルエン、キシレン、アセトン、脂肪族アルコール、ベンゼンあるいは酢酸エチルなどを用いることができ、これらは0.1~50μl/ml、好ましくは1~20μl/mlの濃度で用いられる。

また、コリネバクテリウム属またはプレビバク

実施例1

種培地〔ブイヨン20g/l、酵母エキス5g/l、グルコース5g/lの組成からなり、pH7.2に調整した培地〕5ml中でコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032を30℃、24時間培養した。

得られた培養物2mlを、1l容振盪フラスコに分注し滅菌した200mlのSSM培地〔グルコース10g/l、NH₄Cl 4g/l、尿素2g/l、酵母エキス1g/l、KH₂PO₄ 1g/l、K₂HPO₄ 1g/l、MgCl₂·6H₂O 0.4g/l、FeSO₄·7H₂O 10mg/l、MnSO₄·4-6H₂O 0.2mg/l、ZnSO₄·7H₂O 0.9mg/l、CuSO₄·5H₂O 0.4mg/l、Na₂B₄O₇·10H₂O 0.09mg/l、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.04mg/l、ビオチン30μg/l、サイアミン塩酸塩1mg/lの組成からなりpH7.2に調整した培地〕に接種し、30℃で15時間振盪培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、生理

食塩水で洗浄後、再度遠心分離し湿菌体を集めた。
得られた湿菌体 0.1 g を、O-アセチル-L-セリン 5.3 mg、水酸化ナトリウム 2.8 mg、ピロキサルリン酸 0.27 mg、キシレン 10 mg を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 1 ml (pH 7.0) に加え、25℃で2時間反応させた。

反応液中のL-システインおよび/またはL-シスチンの量をガイ佟デの方法[Biochem. J. 104, 626 (1967)]により定量したところ、3.3 mg (システイン換算) のL-システインおよび/またはL-シスチン生成が認められた。

実施例 2

コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 13032 より変異処理によって得られたトリプトファンゼ欠損株 TA108 (FERM BP-1846) を、SSM 培地にトリプトファン 100 mg/ℓ 加えた培地で培養をおこなう以外は実施例 1 と同様に培養した。得られた湿菌体を用いて実施例 1 と同様な反応をおこなったところ、3.0 mg

2 g/ℓ、KH₂PO₄ 1 g/ℓ、K₂HPO₄ 0.5 g/ℓ、MgSO₄・7H₂O 0.5 g/ℓ、FeSO₄・7H₂O 0.2 mg/ℓ、CuSO₄・5H₂O 1 mg/ℓ、MnSO₄・4H₂O 10 mg/ℓ、サイアミン塩酸塩 1 mg/ℓ、尿素 5 g/ℓ の組成からなり、pH 6.5 に調整した培地) に接種し、ペニシリン G を 5 単位/ml 添加して 30℃で、30 日間振盪培養をおこなった。培養中、培養液を pH 6~8 に保つため、培養開始から 12 時間目と 20 時間目に 10% 尿素液を 1 ml ずつ添加した。(このとき培養上清中には 27.3 mg/ml のグルタミン酸が蓄積した。)

培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、生理食塩水で洗浄後再度遠心分離し、湿菌体(a)を得た。

一方、ペニシリン G を添加しない以外は上記と同様に培養し調整された湿菌体(b)を用意した。

両湿菌体を用い、反応時間を 10 分間とした以外は実施例 1 と同様な条件でそれぞれ反応をおこなった。キシレン 10 mg 添加および無添加の条件

(システイン換算) のL-システインおよび/またはL-シスチンの生成が認められた。

実施例 3

ブレヴィバクテリウム・フラブム ATCC 13826 を実施例 1 と同様な方法で培養し、得られた湿菌体を用いて実施例 1 と同様な反応をおこなった。

その結果、3.2 mg (システイン換算) のL-システインおよび/またはL-シスチンの生成が認められた。

実施例 4

種培地 [グルコース 40 g/ℓ、ポリペプトン 20 g/ℓ、KH₂PO₄ 1.5 g/ℓ、K₂HPO₄ 0.5 g/ℓ、MgSO₄・7H₂O 0.5 g/ℓ、ピオチン 30 mg/ℓ、尿素 3 g/ℓ の組成からなり pH 7.2 に調整した培地] 5 ml 中でコリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 13032 を 30℃で、24 時間培養した。

得られた培養物 4 ml を、300 ml 容三角フラスコに分注し滅菌した 20 ml の脱糖蜜培地 [脱糖蜜 60 g/ℓ (グルコース換算)、(NH₄)₂SO₄

で反応をおこなったときのL-システインおよび/またはL-シスチンの生成量 (システイン換算) を第 1 表に示す。

第 1 表

反応に 用いた 湿菌体	L-システインおよび/またはL-シスチンの生成量 (mg)	
	キシレン無添加	キシレン添加
(a)	0.5	1.8
(b)	2.9	3.0

発明の 効 果

本発明によれば、収率よくL-含硫アミノ酸とくにL-システインおよび/またはL-シスチンを製造することができる。

特許出願人 (102) 協和 興 産 工 業 株 式 会 社

代 表 者 加 藤 幹 夫

